

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Natálie Řezková

Mechanismy regulující fyziologickou dormanci semen
Mechanisms that control physiological seed dormancy

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jan Ponert

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.8.2018

Podpis

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Janu Ponertovi za trpělivost a veškerou pomoc a čas, které mi věnoval při odborných konzultacích.

Abstrakt

Fyziologická dormance je důležitá vývojová vlastnost zajišťující, že semeno nevyklíčí, když jsou vhodné podmínky pouze dočasné. Přechod semene z dormance ke klíčení je regulován velkým množstvím faktorů. Zásadní roli zde hraje fytohormon kyselina abscisová (ABA). Zvýšení míry biosyntézy a odezvy na ABA je stěžejním mechanismem při navození a udržení dormance. Protichůdně vůči ABA působí gibereliny (GA). Jejich biosyntéza a naopak katabolismus ABA jsou pozitivními regulátory klíčení. Ukazuje se, že do regulace dormance, popř. klíčení, jsou zapojeny i další fytohormony. Z těch je nejlépe popsán vliv etylénu, který stejně jako GA podporuje klíčení. Na molekulární úrovni může být dormance ovlivněna prostřednictvím remodelace chromatinu, dále geny, jejichž produkty se uplatňují výhradně při dormanci [např. *DELAY OF GERMINATION 1 (DOG1)*] nebo geny jejichž produkty zprostředkovávají odpověď semene na podmínky prostředí. Navození, hloubka nebo zrušení dormance závisí nejen na podmínkách prostředí, kterým je vystaveno zralé semeno, ale také na podmínkách během zrání semene na mateřské rostlině, kdy dochází k navození primární dormance. Konkrétní požadavky ke zrušení dormance a indukci klíčení se v závislosti na druhu mohou výrazně lišit. Fyziologická dormance je tedy komplexně řízený proces, který odráží vlivy většího množství faktorů.

Klíčová slova: dormance, klíčení, kyselina abscisová, gibereliny, semeno

Abstract

Physiological dormancy is an important developmental trait ensuring that seed does not germinate when the environmental factors are appropriate only temporary. The transition from seed dormancy to germination is regulated by a large number of factors and the phytohormone abscisic acid (ABA) plays a crucial role. Enhanced response to ABA and its biosynthesis is a key mechanism in dormancy induction and maintenance. ABA interacts antagonistically with gibberellins (GAs). Therefore GA biosynthesis and ABA catabolism are positive germination regulators. However, other phytohormones are also involved in the regulation of dormancy and germination. The most studied is ethylene which supports germination similarly to GA. Numerous factors affect dormancy at molecular level, namely chromatin remodeling, gene products that function only in dormancy regulation [e.g. *DELAY OF GERMINATION 1 (DOG1)*] or gene products that mediate seed response to environmental factors. The dormancy, its induction, depth and release, is driven not only by environmental conditions affecting mature seeds, but also by conditions acting during seed maturation in a maternal plant when the primary dormancy is induced. Requirements for dormancy release and germination induction may vary considerably between species. The physiological dormancy is therefore a complexly controlled process which is affected by a large number of factors.

Keywords: dormancy, germination, abscisic acid, gibberellin, seed

Obsah

Úvod	6
1 Klasifikace dormance	7
2 Působení fytohormonů na dormanci	9
2.1 Kyselina abscisová	9
2.1.1 Signalizace ABA	11
2.2 Gibereliny	12
2.3 Etylén	13
2.4 Interakce fytohormonů	14
3 Molekulární mechanismy regulující dormanci	16
3.1 Regulace dormance prostřednictvím struktury chromatinu	16
3.2 DOG1	17
3.3 MFT	18
3.4 Reaktivní formy kyslíku	18
4 Vliv podmínek prostředí na dormanci	20
4.1 Teplota	20
4.2 Světlo	22
4.3 Dusičnany	23
4.4 Kouř	24
Závěr	25
Seznam použitých zkratk	26
Seznam použité literatury	28

Úvod

Dormance semen je důležitou vývojovou adaptací. Definuje se jako stav, kdy nepoškozené životaschopné semeno neklíčí, přestože jsou příznivé podmínky (Bewley, 1997). Navození dormance nastává během zrání semene a je doprovázeno akumulací zásobních látek a získáním tolerance k vysušení. Během dormance je v semeni velmi nízká metabolická aktivita a dočasná necitlivost k signálům podporujícím růst (Graeber *et al.*, 2012). Zrušení dormance a navození klíčení může být podporováno různými faktory, zahrnujícími after-ripening, což je překládáno jako posklizňové dozrávání a znamená období, během něž je čerstvě sklizené, zralé semeno skladováno v suchu při určité teplotě (Bewley, 1997). Dále může uvolnění dormance podpořit poškození obalu semene (skarifikace) nebo různá ošetření nabobtnalých semen. Např. studená stratifikace, teplá stratifikace, světlo, gibereliny či jiné fytohormony (Kucera *et al.*, 2005).

S dormancí semene úzce souvisí jeho následné klíčení a často záleží pouze na nakreslení pomyslné linie mezi těmito dvěma ději. Proto jsou v této práci kromě mechanismů regulujících dormanci popisovány v menší míře i mechanismy klíčení. Samo klíčení začíná příjmem vody suchým semenem imbibicí neboli bobtnáním, což je následováno expanzí embrya a končíva protržením krycích vrstev (u většiny krytosemenných jsou to endosperm a osemení) a růstem radikuly. Radikula roste díky elongaci buněk a je obecně přijímáno, že je to k dokončení jejího růstu během klíčení dostačující a že buněčné dělení není nezbytné (Kucera *et al.*, 2005).

V práci budou popsány faktory, které ovlivňují dormanci, s důrazem na fytohormony kyselinu abscisovou (ABA) a gibereliny (GA), jejichž různá míra biosyntézy a katabolismu je stěžejním mechanismem regulujícím dormanci. Další uváděné faktory jako reaktivní formy kyslíku (ROS), podmínky prostředí a molekulární mechanismy obvykle působí právě přes regulaci exprese genů biosyntézy a katabolismu ABA a GA nebo mění míru odezvy na ně.

1 Klasifikace dormance

Před samotným popisem mechanismů fyziologické dormance bude tato třída dormance zasazena do kontextu dalších možných způsobů nahlížení na dormanci semen. A to podle klasifikace Baskina a Baskinové (2004), kteří dělí dormanci do pěti tříd – fyziologické (PD), morfologické (MD), morfofyziologické (MPD), fyzikální (PY) a kombinované dormance. Tyto třídy se mohou dále dělit na úrovně a na typy. Tento systém nezahrnuje rostliny, u nichž mají zralá semena nediferencovaná embrya, např. čeleď *Orchidaceae*.

U PD se rozlišují tři úrovně – hluboká, střední a nehluboká dormance, z nichž poslední jmenovaná je nejčastější. Rozdíl mezi hlubokou a nehlubokou dormancí je, že GA u semen v hluboké PD nepodporí klíčení, k porušení dormance je potřeba okolo 3-4 měsíců studené stratifikace a vyňatá embrya nerostou nebo tvoří abnormální semenáče. Naopak u semen v nehluboké PD GA klíčení podporují, v závislosti na druhu vyžadují semena studenou (0-10°C) nebo teplou (>15°C) stratifikaci a izolovaná embrya produkují normální semenáče (Baskin *et* Baskin, 2004).

MD lze nalézt v období šíření semen z mateřské rostliny buď u semen s malými nedovyvinutými, ale diferencovanými embryi (tzn. dělohy lze odlišit od hypokotylu s radikulou), která potřebují k tomu, aby vyklíčila, nejprve růst. Nebo u semen, jejichž embrya jsou nediferencovaná, tvořená pouze masou buněk. Taková semena musí před vyklíčením jak růst, tak se také diferencovat (Baskin *et* Baskin, 1998).

MPD je kombinací PD a MD a vyskytuje se tedy u semen s nedovyvinutými embryi s fyziologickou dormancí. Před klíčením musí embryo dorůst do potřebné velikosti a zároveň dojít ke zrušení PD. V závislosti na druhu mohou být podmínky pro tyto dva kroky shodné nebo odlišné. Může být potřebná pouze studená nebo pouze teplá stratifikace anebo její různé kombinace (Baskin *et* Baskin, 1998). V některých případech nehluboké PD může být stratifikace nahrazena GA (Finch-Savage *et* Leubner-Metzger, 2006).

PY je způsobena jednou nebo více vrstvami buněk v osemení, které jsou nepropustné pro vodu. Jakmile je umožněn přístup vodě, semeno ztrácí dormanci a může klíčit v širokém rozsahu teplotních podmínek bez závislosti na světle (Baskin *et* Baskin, 1998; 2000).

Semena, která mají pro vodu nepropustné osemení a embrya v nehluboké PD, mají tzv. kombinovanou dormanci (Baskin *et* Baskin, 1998).

Dalším možným způsobem, jak nahlížet na dormanci, je dělení podle jejího vzniku. V tomto případě se ale jedná spíše o fáze dormance s plynulými přechody pozorovatelné v praxi, než o jasně ohraničenou klasifikaci, jako tomu bylo v prvním případě.

Dormance navozená během zrání semen na mateřské rostlině se nazývá primární. Dělí se podle toho, která část semene zajišťuje dormantní vlastnosti, na *embryonální* a *obalovou* (způsobená osemením nebo endospermem). Embrya s druhým typem dormance izolovaná ze semen nejsou dormantní a po imbibici klíčí (Bewley, 1997). Primární dormance je zároveň i zabezpečení proti

předčasnému vyklíčení semene na mateřské rostlině. V případě, že neklíčí semeno, které není dormantní (dále nedormantní semeno), znamená to, že prostředí nesplňuje jeden nebo více fyzikálních faktorů potřebných pro klíčení (přítomnost vody, optimální teplotu, světelné podmínky, atd.). Faktory mohou být odlišné v závislosti na druhu i populaci. Takovéto neklíčící semeno se nachází ve stavu klidu (z angl. quiescence) (Baskin *et* Baskin, 2004), též nazývaném vynucená dormance (enforced dormancy) podle Harpera (1977) nebo pseudodormance (Karssen, 1995).

U nedormantního semene může být dormance znovu navozena. Tento stav se nazývá sekundární dormance a může nastat v případě, když nejsou pro klíčení vhodné podmínky prostředí (Karssen, 1995). Mezi těmito stavy – nedormantním a sekundárně dormantním – může semeno s nehlubokou PD opakovaně cyklovat. Změna semene z dormantního (jak primárně, tak sekundárně) do nedormantního probíhá plynule sérií přechodových fyziologických stádií. Semeno v jakémkoliv z těchto stádií je v tzv. podmíněné dormanci. Spolu s tím, jak semeno postupně ztrácí dormanci, se zvětšuje rozsah podmínek vhodných pro klíčení a naopak, jak se semeno blíží ke stavu sekundární dormance, škála podmínek se zužuje (Baskin *et* Baskin, 1998).

2 Působení fytohormonů na dormanci

Na regulaci dormance mají v určité míře vliv všechny známé fytohormony. ABA a GA však v tomto procesu hrají hlavní roli. Dále je dobře popsán také vliv etylénu na dormanci. Proto se právě těmto třem fytohormonům budu věnovat nejvíce. Ostatní fytohormony budou zmíněny v závěrečné kapitole o interakcích fytohormonů.

2.1 Kyselina abscisová

ABA je pozitivním regulátorem navození a udržení dormance. Ve vyvíjejících se semenech se nachází ABA původem z mateřské rostliny i ABA produkovaná samotným embryem. Reciprokým křížením mezi wild-type (WT) a ABA-deficientními rostlinami huseníčku *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že pouze embryonální ABA je nezbytná k navození dormance a nezáleží na tom, zda je či není přítomná ABA mateřská, popř. exogenní ABA, která svým účinkem připomíná mateřskou (Karssen, 1983). Na udržení či hloubku dormance pak může mít vliv i exogenní ABA. Ke stejnému závěru o nezbytnosti embryonální ABA k navození dormance došla i studie s tabákem *Nicotiana glauca* (Frey *et al.*, 1999).

Nadměrná míra exprese genů pro biosyntézu ABA může zvýšit její obsah v semeni a zesílit dormanci nebo oddálit klíčení (Frey *et al.*, 1999). Naopak nedostatek ABA v semeni během vývoje způsobený nedostatečnou biosyntézou nebo necitlivostí k ní má za následek sníženou dormanci a v některých případech viviparii nebo předčasné klíčení, např. u *viviparous* (*vp*) mutantů kukuřice (Finkelstein *et al.*, 2002). Mezi další mutantní rostliny se semeny s redukovanou dormancí patří *ABA-deficient* (*aba*), *ABA-insensitive* (*abi*) a *reduced dormancy* (*rdo*) u huseníčku, *sitiens* (*sit*), *flacca* (*flc*) a *notabilis* (*not*) u rajčete a *aba2* u tabáku. *aba1* mutantní huseníčku a *aba2* tabáku mají poškozený enzym zeaxantin epoxidáza, který katalyzuje přeměnu zeaxantinu na anteraxantin a následně violaxantin, což je první krok biosyntézy ABA (Marin *et al.*, 1996). U *not*, stejně jako u *vp14*, dochází k poškození klíčového regulačního kroku biosyntézy ABA, a to k defektu oxidativního štěpení prekurzoru C₄₀ 9-*cis* xantofylu, z něhož by dále vznikal C₁₅ meziprodukt, xantoxin (Burbidge *et al.*, 1999). U *flc*, *sit*, *Arabidopsis aba3* a tabákového *aba1* neprobíhá poslední krok biosyntézy ABA – oxidace ABA-aldehydu na ABA (Karssen, 1995; Seo et Koshiba, 2002). Všechny výše zmiňované mutantní linie jsou tedy ve výsledku ABA-deficientní a úroveň endogenní ABA je zde výrazně nižší než u WT semen (Karssen, 1995). Naopak u *abi* mutantů je hladina endogenní ABA v semenech podobná nebo lehce vyšší než u WT rostlin, přesto vykazují redukovanou dormanci. Mají několikanásobně nižší citlivost k ABA přidané do kultivačního média během klíčení oproti ABA-deficientním liniím (Koornneef *et al.*, 1984). Snížená citlivost k ABA je u *abi1* a *abi2* způsobena porušením vazby ABI s receptory ABA (viz kap. o signalizaci ABA) (Ma *et al.*, 2009). V případě *abi4*

se jedná o neschopnost ABI4 navázat se na geny katabolismu ABA a tím je inhibovat. V důsledku toho je v těchto semenech redukována hladina ABA (Shu *et al.*, 2013).

Ke zkoumání dormance slouží kromě mutantních rostlin také rozdíly mezi ekotypy *A. thaliana*. A to např. Cape Verde Islands (Cvi), Columbia (Col-0) nebo Landsberg *erecta* (Ler). Semena Cvi jsou v porovnání s ostatními zmíněnými ekotypy silně dormantní a mají vysoký obsah ABA (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že u Cvi ekotypu dochází po imbibici dormantních i nedormantních semen prošlých after-ripeningem k poklesu hladiny endogenní ABA. U dormantních semen však obsah ABA následně narůstá a po 3 dnech od začátku imbibice je srovnatelný s hladinou ABA v suchých dormantních semenech, zatímco obsah ABA v nedormantních semenech klesá na trojnásobně nižší hladinu, než v suchých semenech. Z toho vyplývá, že *de novo* biosyntéza ABA během imbibice má vliv na udržení dormance (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Ke stejným výsledkům došli i výzkumy s *N. plumbaginifolia*, *Helianthus annuus* a *Hordeum vulgare* (Grappin *et al.*, 2000; Le Page-Degivry et Garello, 1992; Wang *et al.*, 1995).

Jak bylo zmíněno výše, klíčovým regulačním krokem biosyntézy ABA je štěpení 9-*cis* xantofylu na xantoxin, prekurzor ABA. Tento krok je katalyzován 9-*cis* epoxykarotenoid dioxygenázami (NCED). U huseníčku se podílí na produkci ABA pět enzymů kódovaných geny *AtNCED 2, 3, 5, 6* a *9* (Tan *et al.*, 2003). V semenech se vysokou mírou exprimují *AtNCED6* a *AtNCED9*. Zatímco exprese *AtNCED6* byla detekována pouze v endospermu, *AtNCED9* je kromě endospermu exprimován také v embryu. Zvýšená míra exprese těchto genů vede ke zvýšení množství ABA v semenech. Naopak v *Atnced6* mutantních semenech je obsah ABA znatelně redukován (Lefebvre *et al.*, 2006).

Co se týče katabolismu ABA, za jeho klíčový enzym je považována ABA 8'-hydroxyláza. U huseníčku je kódována čtyřmi členy genové rodiny *CYP707A* (*CYP707A1* až *CYP707A4*), z nichž každý má rozdílnou úlohu během klíčení a dormance (Kushiro *et al.*, 2004). Na redukcí ABA v rané fázi zrání semene se podílí především *CYP707A1* a částečně také *CYP707A3*. Následně v pozdější fázi zrání až po začátek klíčení hraje hlavní roli v regulaci množství ABA *CYP707A2*. Exprese *CYP707A4* byla detekována pouze v obalech šesule, proto se zdá, že produkt tohoto genu nemá úlohu v regulaci obsahu ABA v semeni (Okamoto *et al.*, 2006). Exprese *CYP707A1* a *CYP707A2* může být potlačena navázáním transkripčního faktoru (TF) ABI4, čímž se následně zvýší akumulace ABA (Shu *et al.*, 2013). ABI4 tak pozitivně reguluje primární dormanci zvýšením množství ABA. Ztráta funkce ABI4 má navíc za následek kromě sníženého obsahu ABA zvýšenou biosyntézu GA a sníženou míru exprese genů, které GA inaktivují, což společně vede ke snížené primární dormanci v *abi4*. Je proto možné, že ABI4 zprostředkovává rovnováhu mezi biosyntézou ABA a GA (Shu *et al.*, 2013).

Vzhledem k tomu, že dvojité i jednoduché mutanty *cyp707a* vykazují výrazně vyšší obsah endogenní ABA oproti WT semenům, je zřejmé, že hydroxylace ABA je hlavní dráhou v regulaci množství ABA při vývoji a klíčení semene u huseníčku (Okamoto *et al.*, 2006). Vysoká dormance

u *cyp707a2* navíc ukazuje, že právě tento enzym je u huseníčku klíčový pro zrušení dormance (Kushiro *et al.*, 2004).

ABA má patrně nejzásadnější vliv na dormanci, a proto její signalizaci bude věnována následující samostatná kapitola.

2.1.1 Signalizace ABA

Při ABA signalizaci jsou v huseníčku ústředními regulátory protein fosfatázy 2C (PP2C). V nepřítomnosti ABA se PP2C vážou na proteinové kinázy SnRK2 [SNF1 (sucrose non-fermenting 1)-related protein kinase 2] a defosforylací je deaktivují, čímž vlastně znemožní přenos signalizace ABA (Umezawa *et al.*, 2009). V přítomnosti ABA se ABA, váže na své receptory PYR/PYL/RCAR, následkem čehož se PP2C oddělí od SnRK2 a vytvoří komplex s receptory ABA (Ma *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2009). Mezi takové PP2C proteiny, které negativně ovlivňují dormanci, patří ABI1, ABI2 a HONSU.

Vzhledem k funkci PP2C by měla mutantní semena *abi1* a *abi2* vykazovat silnější dormanci. Ona ovšem vykazují dormanci redukovanou a výrazně sníženou citlivost k ABA (Gosti *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2009). Jednoduchým vysvětlením tohoto jevu by byla zvýšená aktivita PP2C, což se ovšem neshoduje s výsledky pozorování. Možným důvodem je to, že zbytková aktivita PP2C není nadále regulována ABA a že tato aktivita je dostatečná k potlačení odezvy ABA. U revertantů, mutantů s opětovně získaným wild-type fenotypem, by pak ztráta zbytkové aktivity PP2C přispěla k potlačení fenotypu *abi1*, což se s výsledky pozorování shoduje a revertanti *abi1* vykazují naopak zvýšenou citlivost k ABA (Gosti *et al.*, 1999). Novějším názorem zahrnujícím i receptory ABA je, že interakce mezi receptory ABA a ABI1 nebo ABI2 je v případě jejich mutace téměř úplně zrušena (Ma *et al.*, 2009). Díky tomu by mohlo ABI1 nebo ABI2 nadále inhibovat SnRK2 a tím snižovat odezvu k ABA a vykazovat redukovanou dormanci (Ma *et al.*, 2009). Zatím ale nejsou práce, které by zkoumaly, zda má změněná struktura ABI1 a ABI2 vliv pouze na interakci s ABA receptory PYR/PYL/RCAR nebo i se SnRK2.

Také HONSU inhibuje signalizaci ABA. Zároveň ale aktivuje signalizaci GA, což z něj dělá jeden z možných klíčových faktorů při interakci těchto dvou fytohormonů (Kim *et al.*, 2013). Mutantní linie *honsu* se ztrátou funkce, tentokrát už v souladu s očekáváním, vykazuje hlubší dormanci oproti WT semenům. Naopak zvýšená míra exprese *HONSU* má za následek, že semena mají značně slabší dormanci. Závislost zde však funguje i obráceně a exprese *HONSU* je regulována hloubkou dormance (Kim *et al.*, 2013).

Ne všechny PP2C proteiny s vlivem na dormanci se účastní výše popsané signalizační kaskády ABA. PP2C jsou velkou genovou rodinou, kterou lze na základě sekvenční podobnosti rozdělit do 10 hlavních skupin, přičemž pouze zástupci skupiny A interagují s receptory ABA (Schweighofer *et al.*, 2004). Někteří zástupci PP2C rodiny se ale mohou účastnit regulace dormance jinými mechanismy, např. RDO5, u jehož mutantů *rdo5* zůstává vnímání ABA nezměněné. *RDO5* je exprimován pouze

v semenech a uplatňuje se patrně výhradně při regulaci dormance, naopak ostatní geny ovlivňující dormanci mívají úlohu i v dalších rostlinných procesech (Xiang *et al.*, 2014). RDO5 patně ovlivňuje dormanci potlačením exprese genů *Arabidopsis PUMILIO9* (*APUM9*) a *Arabidopsis PUMILIO11* (*APUM11*), které kódují proteiny interagující s RNA (Xiang *et al.*, 2014).

ABA aktivované proteinové kinázy SnRK 2.2, SnRK 2.6 a SnRK 2.3 během zrání semene regulují genovou expresi fosforylací ABI5 a dalších TF zajišťujících odezvu na ABA. Tojitý mutant *snrk2.2 snrk2.3 snrk2.6* vykazuje téměř úplnou ztrátu dormance, viviparii, silně zvýšenou necitlivost k ABA a sníženou toleranci k vysychání (Nakashima *et al.*, 2009). ABI5 je TF, který aktivuje velké množství genů reagujících na ABA (Zhou *et al.*, 2015). *abi5* má sníženou citlivost k inhibici klíčení prostřednictvím ABA (Nakashima *et al.*, 2009). Transkripce ABI5 je kromě výše zmíněných SnRK2 pozitivně regulována také TF SPATULA (SPT), který je rovněž považován za klíčový faktor regulačních drah dormance. Dalším cílovým proteinem ABI5 je např. pozitivní regulátor primární dormance, ABI4 (Vaistij *et al.*, 2013).

2.2 Gibereliny

GA mají zásadní vliv na zrušení dormance a počátek klíčení. Zrušení dormance závisí na snížení poměru ABA a GA, nikoli na samotném obsahu hormonů (Karssen et Lacka, 1986). Ke snížení tohoto poměru dochází při zrušení dormance degradací ABA a zvýšenou biosyntézou GA (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006). Samostatně pak hrají GA roli především v procesu klíčení a v dalších aspektech vývoje semene (Kucera *et al.*, 2005).

Jelikož není vždy snadno a jasně odlišitelné působení na samotnou dormanci od působení na klíčení, následující odstavec pojednává souhrnně o procesech, které se odehrávají při rušení dormance a indukci klíčení.

GA indukují klíčení zeslabením krycích pletiv semene, čímž umožňují růst radikuly. Tato funkce GA vyplývá např. ze studie s mutantními rostlinami *Arabidopsis*. Semena některých dvojítych mutantů *tt* (*transparent testa* s narušeným osemením) a *gal* (GA-deficientní mutant s porušenou biosyntézou GA, který ke klíčení potřebuje exogenní GA) klíčí po imbibici v optimálních podmínkách i bez přidání exogenních GA do média, což naznačuje, že GA jsou nezbytné právě pro překonání této mechanické překážky v podobě osemení. Stejně tak odstranění osemení u GA-deficientních mutantů vede k vyklíčení semene (Debeaujon et Koornneef, 2000). Také u semen rajčete *Lycopersicon esculentum* vede odstranění endospermu a osemení k vyklíčení *gib-1* (GA-deficientní mutant) semen ve vodě, zatímco WT semena klíčí po oslabení krycích vrstev účinkem endogenních GA (Groot et Karssen 1987). Vztah přítomnosti GA a schopnosti překonat mechanickou překážku v podobě osemení a endospermu, popř. aleuronové vrstvy byl prokázán také u ječmene *Hordeum distichum* (Schuurink *et al.*, 1992) a tabáku *Nicotiana tabacum* (Leubner-Metzger *et al.*, 1996). GA u obilovin

indukují v buňkách aleuronové vrstvy tvorbu α -amylázy, která štěpí endosperm a aktivuje tím zásobní látky potřebné pro vyklíčení rostliny (Gubler *et al.*, 1995).

Biosyntéza GA je zprostředkována enzymy GA 20-oxidázami (GA20ox) a GA 3 β -hydroxylázami (GA3ox1 a GA3ox2). Katabolismus GA je zajišťován GA 2 β -hydroxylázami (GA2ox) (Rieu *et al.*, 2008, Oh *et al.*, 2006). Expresi těchto genů je regulována mimo jiné např. PIF3-like 5 (PIL5), TF fytochromů. Fytochromy vnímají červené světlo, jeden ze signálů podporujících klíčení. PIL5 negativně reguluje biosyntézu GA tím, že potlačuje expresi *GA3ox1* a *GA3ox2* a naopak aktivuje expresi genů katabolismu GA *GA2ox*. Červené světlo pak spouští degradaci PIL5 proteinu (Oh, *et al.*, 2006).

2.3 Etylén

Etylén je dalším fytohormonem podporujícím klíčení. U některých druhů rostlin produkce etylénu na začátku imbibice přispívá ke zrušení dormance (Matilla, 2000). Stejně tak jeho exogenní aplikace odstraňuje u některých druhů primární a/nebo sekundární dormanci. Zde pak záleží na množství aplikovaného etylénu (Kepczynski *et al.*, 1997). U některých druhů, např. u *Chenopodium album*, etylén přímo stimuluje klíčení dormantních semen. Tento efekt zde může být zvýšen přítomností dusičnanů (Saini *et al.*, 1985). Naproti tomu nedormantní semena tohoto druhu, přestože etylén produkují, ho k růstu radikuly nepotřebují. U mnoha dalších druhů ale etylén klíčení nedormantních semen podporuje a obecně je jeho produkce v nedormantních semenech vyšší než u semen dormantních (Matilla, 2000; Kucera *et al.*, 2005).

Etylén je v rostlinách syntetizován z metioninu přes andenosyl-metionin a kyselinu 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou (ACC). Inhibice přeměny ACC na etylén, a tedy jeho nedostatek v semenech, je spojen s termodormací navozenou vysokými teplotami (cca 30 – 45 °C v závislosti na druhu) u semen cizrny, slunečnice a salátu (Gallardo *et al.*, 1991; Corbineau *et al.*, 1988; Prusinski *et al.*, 1990).

U huseníčku je etylén vnímán pěti membránovými receptory: ETR1 (Ethylene receptor 1), ETR2, ERS1 (Ethylene response sensor 1), ERS2 a EIN4 (ethylene insensitive). Navázání etylénu probíhá na N-konci transmembránové domény receptorů a pro navázání je nutná přítomnost mědi jako kofaktoru. Navázání etylénu receptory deaktivuje, což dále deaktivuje proteinovou kinázu CTR1 (constitutive triple-response), negativní regulátor signální dráhy etylénu (Wang *et al.*, 2002; Kieber *et al.*, 1993). Následujícím krokem v signalizační dráze etylénu je EIN2. *EIN2* je jediným známým genem, jehož ztráta funkce vede k úplné ztrátě citlivosti k etylénu, proto je pravděpodobně klíčovým pozitivním regulátorem v jeho signalizační dráze (Alonso *et al.*, 1999). Signál je dále přenášen do jádra k TF EIN3. EIN3 se váže na promotor TF *ERF1* (ethylene response factor), zahájí jejich transkripci a aktivuje tak odezvu na etylén (Wang *et al.*, 2002).

Ošetření semenáčů *Arabidopsis* etylénem má za následek typickou trojnou odezvu zahrnující tloušťnutí a zkracování stonku, nadměrnou tvorbu apikálního háčku a kořeny rostoucí negativně geotropicky. Mutantní rostliny s nefunkčními receptory a tedy necitlivostí k etylénu tento fenotyp neprojevují. Z toho také vychází názvy výše popsaných receptorů. EIN se nazývá podle anglického *ethylene-insensitive*, CTR pak vychází z *constitutive triple-response*, který projevuje trojnou odezvu i při absenci etylénu (Wang *et al.*, 2002). Vzhledem k této necitlivosti je proto např. u *etr1-2* větší poměr zralých dormantních semen oproti WT (Chiwocha *et al.*, 2005).

2.4 Interakce fytohormonů

Jak bylo popsáno výše, ABA navozuje dormanci ve vyvíjejících se semenech a GA podporují klíčení nedormantních semen. Pro zrušení dormance je zásadní snížení poměru ABA a GA. Oba fytohormony sice působí odděleně v různých vývojových stádiích semene, přesto spolu interagují. Koncentrace ABA v semeni během vývoje ovlivní sílu fyziologické blokády, kterou je nutné ke klíčení překonat a tím dále ovlivní množství GA potřebných pro iniciaci klíčení. Semena s nízkou hladinou ABA tedy budou vyžadovat menší množství GA ke klíčení oproti semenům, která měla během navození dormance vysokou koncentraci ABA v semeni (Karssen *et Lacka*, 1986).

Etylén je v některých případech schopný plně nahradit GA, jak ukazuje pozorování *gal* mutantních semen, která na světle klíčí vlivem etylénu (Karssen *et al.*, 1989). Podobně GA indukují klíčení u semen s mutací v receptoru etylénu ETR (Karssen *et al.*, 1989; Bleecker *et al.*, 1988). Na zastupitelnost etylénu a GA poukazuje také fakt, že etylén a ABA mají stejně jako GA a ABA protichůdné funkce (Beaudoin *et al.*, 2000).

ABA interaguje protichůdně také s brasinosteroidy (BR). U mutantů s nedostatečnou biosyntézou BR nebo odezvou na ně inhibuje ABA klíčení silněji než u WT. BR jsou tedy potřeba k překonání inhibice klíčení vyvolanou ABA (Steber *et McCourt*, 2001). Naopak represor signalizace BR BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2) pozitivně reguluje odezvu na ABA při klíčení. A to tak, že BIN2 interaguje s ABI5, které v přítomnosti ABA fosforyluje a stabilizuje. Exogenní aplikace aktivní formy BR tuto regulaci inhibuje (Hu *et Yu*, 2014).

BR jsou podobně jako etylén schopné nahradit GA u GA-deficientních semen *gal-3*. Ošetření takových semen BR má za následek zrušení dormance a jejich následné vyklíčení. BR také částečně obnovují klíčení u GA-insenzitivních mutantů *sly1*, jejichž klíčení, na rozdíl od *gal* mutantů, nepodporí ani ošetření GA (Steber *et McCourt*, 2001).

Zdá se, že i kyselina salicylová má roli v průběhu klíčení a dormance. U huseníčku, kukuřice a ječmene inhibuje klíčení (Nishimura *et al.*, 2005; Guan *et Scandalios*, 1995; Xie *et al.*, 2007). U ječmene bylo zjištěno, že blokuje klíčení a to potlačením produkce α -amylázy v aleuronové vrstvě obilovin, která je jinak indukována GA (Xie *et al.*, 2007). Dále i fytohormony auxin, cytokininy a kyselina jasmonová (JA) hrají určitou roli v regulaci dormance. Ukázalo se, že exprese Auxin

Response Factor2 (ARF2) je indukovaná ABA a že ARF2 je zároveň negativní regulátor v signální dráze odezvy na ABA a má tak vliv na potlačení dormance (Wang *et al.*, 2011a). Cytokininy mají negativní vliv na dormanci a působí proti ABA down-regulaci ABI5 (Wang *et al.*, 2011b). Funkce JA při klíčení jsou z neznámých důvodů protichůdné - ačkoliv potlačuje expresi genů pro biosyntézu ABA a podporuje geny inaktivující ABA, exogenní aplikace JA má za následek opoždění klíčení (shrnutí podle Shu *et al.*, 2016).

3 Molekulární mechanismy regulující dormanci

Primární dormance je navozena během zrání semene. V této fázi vývoje jsou klíčové čtyři známé TF, a to ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3), FUSCA 3 (FUS3), LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) a LEC2 (Raz *et al.*, 2001). Mutace v těchto TF se projevuje především snížením dormance semen. Dále také poškozením chlorofylu a antokyanů, redukcí akumulace zásobních látek a tolerance k vysychání. Zatímco *fus3* a *lec2* klíčí předčasně pouze v přítomnosti GA, *lec1* je na GA nezávislé, což svědčí o různých regulačních drahách indukce klíčení. Stejně tak vzhledem k faktu, že u *fus3*, *lec1* a *lec2* nastává předčasné klíčení v jiném stádiu vývoje embrya než u *abi3* a *aba1*, je pravděpodobné, že existují alespoň dvě rozdílné dráhy regulace embryonální dormance (Raz *et al.*, 2001).

Síla dormance semene může být nepřímo řízena regulací exprese výše zmíněných genů *ABI3*, *FUS3*, *LEC1* a *LEC2* proteiny s předpokládanou funkcí glutamát karboxypeptidázy (Graeber *et al.*, 2012). V případě huseníčku se jedná o ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1). Griffiths *et al.* (2011) zkoumali ekotypy *A. thaliana* Col-0, C24 a *Ler* a zjistili, že mutace v *AMP1* na ně má odlišný efekt. Zatímco semena Col-0 vykazovala nulovou dormanci a mutace v *AMP1* měla za následek její zvýšení, v případě C24 byla dormance semen silná a *amp1* mutanti naopak projevovali značně sníženou dormanci. Na semena *Ler* neměla mutace v *AMP1* žádný znatelný vliv a jejich dormance zůstala středně silná (Griffiths *et al.*, 2011). Zatím není zcela jasné, jaký mechanismus tento jev způsobuje. Jedním z důvodů může být rozdílné množství ABA v semenech uvedených ekotypů. Ačkoliv korelace mezi ABA a úrovní dormance není vždy úplně přesná. Mutace v *AMP1* však nemá prokazatelný účinek na žádný ze zkoumaných genů pro metabolismus ani signalizaci ABA. A to: *NCED6*, *NCED9*, *CYP707A1*, *CYP707A2*, *ABI3* a *ABI5*. Je tedy možné, že rozdíl v množství ABA je způsoben nepřímou regulací, např. signály od jiných hormonů (Griffiths *et al.*, 2011).

V rýži je faktorem ovlivňujícím regulaci výše zmiňovaných TF PLASTOCHRON3/GOLIATH (PLA3/GO) a u kukuřice VIVIPAROUS 8 (VP8). Mutace v nich se projevuje změnami v dormanci, nejčastěji viviparií semen. (Kawakatsu *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2008).

Následující kapitoly pojednávají o dalších mechanismech regulujících dormanci na molekulární úrovni.

3.1 Regulace dormance prostřednictvím struktury chromatinu

Struktura chromatinu ovlivňuje genovou expresi, čímž reguluje velké množství vývojových procesů (Shu *et al.*, 2016). Genetické a biochemické studie identifikovali faktory ovlivňující strukturu chromatinu, které regulují dormanci a klíčení (Graeber *et al.*, 2012).

Mutanty *histone monoubiquitination 1* (*hul1-1*) (původně pojmenován jako *rdo4*) a *rdo2-1* byly izolovány na základě své redukované dormance (Liu *et al.*, 2007b; 2011). *HUB1* kóduje protein

C3HC4 RING finger, který je potřebný k ubiquitinaci histonu H2B. Ubiquitinace H2B reguluje iniciaci a první kroky transkripce, zatímco deubiquitinace histonu H2B je důležitá pro pokračování transkripce. Ztráta funkce HUB1 proto vede ke změně exprese některých genů, včetně genů podílejících se na dormanci (Liu *et al.*, 2007b). K redukci dormance u *hub1-1* a *rdo2-1* patrně přispívá i down-regulace *DOG1* (Liu *et al.*, 2011).

RDO2 je mimo jiné regulátor genů modifikujících buněčnou stěnu a HUB1 ovlivňuje geny spojené s buněčným cyklem a translací. Tyto geny mají pravděpodobně vliv na zvýšení potenciálu klíčení a míra jejich exprese je v *rdo2-1* a *hub1-1* skutečně zvýšená, což může přispívat k redukci dormance u těchto mutantů (Liu *et al.*, 2011).

Možným vysvětlením úlohy remodelace chromatinu v regulaci dormance je znemožnění aktivace genů podporujících klíčení, které nemohou být aktivovány ani v přítomnosti svých TF, protože jejich vazebná místa nejsou dostupná kvůli stérickému uspořádání (Shu *et al.*, 2016).

3.2 DOG1

Důležitým regulátorem dormance u *Arabidopsis* je *DELAY OF GERMINATION1 (DOG1)*. Byl označen jako hlavní úsek (lokus) kvantitativních znaků (QTL, Quantitative Trait Locus) pro dormanci semen. QTL jsou úseky DNA, které více nebo méně ovlivňují kvantitativní znaky (Alonso Blanco *et al.*, 2003). Množství DOG1 narůstá během zrání semene a následně po celou dobu uskladnění semene a imbibice zůstává stálé, ačkoliv jeho transkripce po imbibici rychle končí (Nakabayashi *et al.*, 2012).

Zatímco v čerstvě sklizených semenech koreluje hladina DOG1 s hloubkou dormance, během after-ripeningu tato korelace mizí. Pravděpodobně změnou struktury proteinu a jeho následnou ztrátou funkce. Čím vyšší je hladina DOG1 v čerstvě sklizených semenech, tím vyšší je dormance a v souvislosti s tím je potřeba delší after-ripening pro její zrušení (Nakabayashi *et al.*, 2012).

Skutečnost, že má *DOG1* pozitivní vliv na hloubku dormance, podporuje zjištění, že míra jeho exprese pozitivně koreluje s expresí *NCED6*, genem pro biosyntézu ABA (Footitt *et al.*, 2011). S tím souvisí fakt, že v mutantních semenech *dog1* je obsah ABA snížený (Nakabayashi *et al.*, 2012). ABA a DOG1 ovšem působí v dráhách, které jsou z velké části na sobě nezávislé, a k navození dormance je nutná přítomnost obou těchto faktorů. Ani vysoký obsah ABA v semenech proto nevede u *dog1* k dormanci a stejně tak nejsou dormantní semena *aba1*, v nichž je zvýšené množství DOG1. Nakabayashi *et al.* (2012) proto předpokládají, že DOG1 nereguluje dormanci přímo přes biosyntézu ABA, nýbrž jeho množství v čerstvě sklizených semenech působí jako časovač pro uvolnění dormance, který funguje z velké části nezávisle na ABA (Nakabayashi *et al.*, 2012).

DOG1 se může navázat sám na sebe a tato vazba je pro jeho funkci důležitá. Rozdíl v efektivitě této vazby ovlivňuje schopnost DOG1 navodit různě silnou dormanci u různých ekotypů *Arabidopsis* podobně, jako rozdíl v úrovni exprese *DOG1* (Nakabayashi *et al.*, 2015). Vysoká transkripce *DOG1* tak může v semenech Cvi ekotypu vést k vysoké dormanci a nízká transkripce *DOG1* v semenech *Ler*

ekotypu k nízké dormanci, zatímco semena Col ekotypu mají nízkou úroveň dormance, ačkoliv je množství *DOG1* vysoké. Jeho schopnost vytvářet homodimery je totiž v tomto ekotypu značně snižena, čímž se snižuje i jeho funkce (Nakabayashi *et al.*, 2015).

3.3 MFT

Dále také MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT) je zapojen do regulace klíčení a dormance. V huseníčku je během klíčení exprese *MFT* regulována prostřednictvím TF ABI3 a ABI5. ABI3 transkripci *MFT* potlačuje a zatímco ABI5 ji podporuje, MFT transkripci *ABI5* naopak potlačuje, čímž zprostředkovává negativní zpětnou vazbu v signalizaci ABA (Xi *et al.*, 2010). Zatímco v tomto případě MFT tlumí dormanci zprostředkovanou ABA, v pšenici je homolog MFT zapojen do odpovědi semene na chlad a u semen vyvíjejících se v nižších teplotách zprostředkovává naopak vyšší úroveň dormance (Nakamura *et al.*, 2011). S tímto pozorováním se shoduje i studie, jejíž výsledky ukazují, že *MFT* spolu s *DOG1* a geny kódujícími proteinové kinázy SnRK 2.1 a SnRK 2.4 podporuje hlubokou dormanci u huseníčku (Footitt *et al.* 2011).

3.4 Reaktivní formy kyslíku

Signalizační dráhy fytohormonů se vzájemně ovlivňují s reaktivními formami kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a předpokládá se, že ROS jsou důležité při zmírnění dormance (Bahin *et al.* 2011).

K ROS patří např. peroxid vodíku (H_2O_2), který funguje jako signální molekula. Během imbibice reguluje katabolismus ABA a syntézu GA, čímž kontroluje dormanci a klíčení. Působí přes zvýšení míry exprese *CYP707A* (především *CYP707A2*), *GA20ox* a *GA3ox* (Liu *et al.*, 2010). Když jsou semena *Arabidopsis* imbibována ve vodě s H_2O_2 , transkripce *CYP707A* se zvýší mnohem rychleji a je udržována na vysoké úrovni po celou dobu imbibice. Pokud je H_2O_2 inhibován, k žádnému zvýšení transkripce nedojde a hladina *CYP707A* zůstane stejná jako ve vodě bez přidaného H_2O_2 . Katabolismus ABA zprostředkovaný signalizací H_2O_2 je podporován prostřednictvím další signální molekuly, oxidu dusnatého (Liu *et al.*, 2010).

Také u semen slunečnice a ječmene bylo pozorováno, že se H_2O_2 účastní regulace dormance. U slunečnice se při after-ripeningu hromadí kromě H_2O_2 další ROS, superoxid ($O_2^{\cdot-}$) (Oracz *et al.*, 2007). ROS mohou reagovat prakticky se všemi biologickými molekulami včetně proteinů, lipidů a DNA. Oxidace proteinů způsobená ROS, neboli karbonylace, může mít za následek modifikaci jejich enzymatické funkce nebo jejich schopnosti se vázat a tím vést k různým funkčním změnám. Během after-ripeningu jsou v semenech slunečnice karbonylované některé zásobní proteiny, což naznačuje, že je zrušení dormance spojeno s přípravou k jejich mobilizaci (Oracz *et al.*, 2007). Tato specifická karbonylace proteinů spojená se zmírněním dormance se spustí také v případě ošetření

semen metylviologinem, sloučeninou tvořící ROS. Také když jsou imbibovaná dormantní semena slunečnice ošetřena kyanidem, který ruší dormanci, dojde ke karbonylaci. To značí o roli ROS a oxidace proteinů jako o možném hlavním mechanismu zrušení dormance (Oracz *et al.*, 2007). V případě ječmene H_2O_2 reguluje dormanci spíše přes aktivaci syntézy a signalizace GA než přes katabolismus ABA jako je tomu u *Arabidopsis*. Při ošetření semen ječmene H_2O_2 je navozena exprese *CA20ox1* a exprese genu *GA2ox3* je naopak omezena. Také u semen ječmen, na rozdíl od slunečnice, nebylo pozorováno zvýšení obsahu ROS během after-ripeningu (Bahin *et al.* 2011).

4 Vliv podmínek prostředí na dormanci

Rostliny reagují na vnější podmínky prostředí a v závislosti na měnícím se ročním období přizpůsobují dormanci svých semen, což zajišťuje vhodné načasování klíčení. Dormance může být v přirozených podmínkách ovlivněna během vývoje na mateřské rostlině nebo v půdní semenné bance teplotou, světlem, kyslíkem, dusičnany, vodou, kouřem nebo alelopatickými látkami (Graeber *et al.*, 2012). Protože se práce zabývá regulací dormance uvnitř semene a mateřské rostliny, nebudu se věnovat alelopatickým látkám. Dále je důležité zmínit, že některé výše probírané faktory, např. fytohormony nebo ROS, mohou pocházet i z okolního prostředí, ale převážně jsou endogenního původu, a proto se jimi zde nebudu znovu zabývat.

Podmínky prostředí jako je vlhkost a teplota půdy souvisejí s pomalými sezónními změnami, které ukazují, kdy je pro klíčení vhodná část roku. V závislosti na tom se mění hloubka dormance a spolu s ní poté citlivost k signálům jako je světlo, dusičnany a střídání teplot, na něž může rostlina reagovat v mnohem kratším čase a ukončit dormanci (Footitt *et al.*, 2011). Z tohoto důvodu je obvykle nutné, aby stimuly prostředí přišly v určitém pořadí, aby mohly být správně přijaty (tzn. dostatek světla a dusičnanů nebude stačit ke zrušení dormance, pokud nebude půda dostatečně vlhká pro vyklíčení semene) (Footitt *et al.*, 2011).

Během toho, jak semeno postupně ztrácí dormanci vlivem after-ripeningu, se zvyšuje jeho citlivost k okolním podmínkám a rozšiřuje se tak škála podmínek vhodných pro vyklíčení (Finch-Savage *et al.*, 2007).

4.1 Teplota

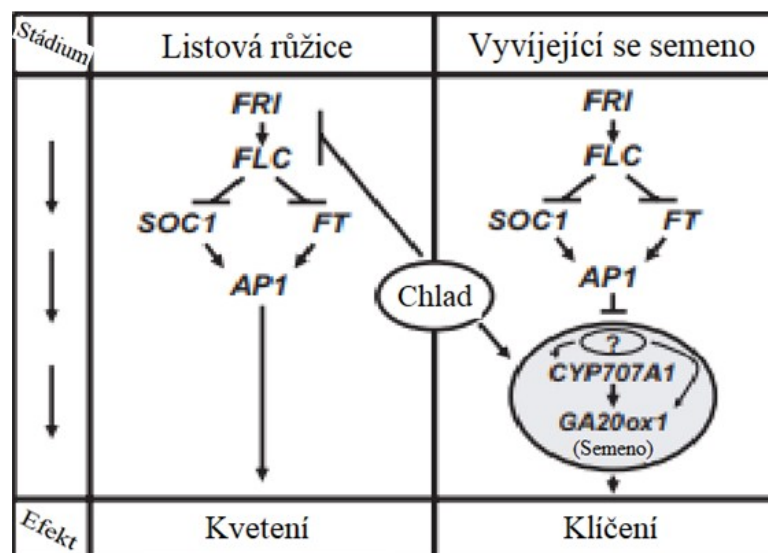
Závislost dormance na teplotě se odvíjí od toho, zda daný druh klíčí na jaře nebo na podzim. Dormantní semena druhů klíčících na jaře potřebují být vystavena nízkým teplotám, aby u nich mohlo dojít ke zrušení dormance. Naopak vyšší teplota ruší dormanci u druhů klíčících na podzim (Baskin et Baskin, 1998). Dále průběh teplot ovlivňuje i hloubku dormance. Vystavení semen nízkým teplotám během zrání může následně způsobit vyšší dormanci u imbibovaných semen (Kendall *et al.*, 2011).

Během zimy, když poklesne teplota půdy, se v semenech huseníčku zvýší míra exprese genů pro syntézu ABA (*NCED6*) a katabolismus GA (*GA2ox2*) a s tím se zvýší i dormance. Zatímco se ale po určité době hladina ABA ustálí, dormance nadále narůstá a spolu s ní i míra exprese *DOG1* a *MFT*. Roste také míra exprese pozitivních regulátorů ABA signalizace, proteinových kináz *SnRK 2.1* a *SnRK 2.4*, čímž se zvyšuje signalizace a citlivost k ABA. Na jaře a v létě pak dormance klesá a spolu s ní i míra exprese genů katabolismu ABA (*CYP707A2*) a biosyntézy GA (*GA3ox1*) (Footitt *et al.*, 2011).

Jak bylo řečeno v úvodu, semeno potřebuje k překonání dormance různá ošetření. Mezi tato ošetření patří i studená stratifikace. Odezva semene na ni – a na červené světlo – je u oseníčku řízena TF SPATULA (SPT) (Penfield *et al.*, 2005). Zatímco WT semena bez studené stratifikace a světla zůstávají dormantní, mutantním semenům *spt-10* se ztrátou funkce SPT stačí k překonání dormance světlo. Skutečnost, že SPT má roli také v odezvě na červené světlo, podporuje fakt, že semena *spt-10* po after-ripeningu klíčí i ve tmě, na rozdíl od WT, která i nadále ke klíčení vyžadují světlo. Dále nestratifikovaná *spt-10* semena mají, na rozdíl od WT, mnohonásobně zvýšenou míru exprese *GA3ox1* a *GA3ox2*. SPT tedy udržuje dormanci prostřednictvím represe transkripce *GA3ox* a to do té doby, dokud nejsou tepelné a světelné podmínky prostředí vhodné pro klíčení (Penfield *et al.*, 2005).

Odpověď na chlad je ve vegetativních pletivech zprostředkována dvěma známými mechanismy – TF C-REPEAT BINDING FACTORS (CBF) a expresí genu *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). Ale u semen *A. thaliana* je při nízkých teplotách hladina CBF zvýšená jen velmi málo. Přesto semena CBF-deficientní linie mají nižší úroveň dormance oproti WT semenům ve stejných podmínkách. Při teplotách pod 10 °C však dojde k navození silné dormance u obou linií stejně. Takže se zdá, že CBF regulují pouze mírnější úroveň dormance. Míra exprese *CBF* koreluje s mírou exprese *DOG1* a *Ga2ox6*. *DOG1* má v oblasti promotoru vazebné místo pro *CBF*, zatímco *Ga2ox6*, zdá se, není přímo cílem *CBF*. Pro transkripci *Ga2ox6* je ale *DOG1* nezbytný. Zvýšená míra exprese *CBF* může zvýšit dormanci, která přetrvává i po studené stratifikaci nebo after-ripeningu (Kendall *et al.*, 2011).

Druhým zmiňovaným mechanismem je exprese genu *FLC*, který je známý primárně jako regulátor kvetení (Chiang *et al.*, 2009). V semenech podporuje klíčení při nízkých teplotách (10 °C) a zvýšení míry jeho exprese během zrání semene později pomáhá překonat primární dormanci při imbibici pravděpodobně díky zvýšené míře exprese *CYP707A2* a *GA20ox1* a tedy opět přes regulaci ABA a GA. Před zapojením těchto dvou fytohormonů působí *FLC* přes signální dráhu, která je shodná s dráhou iniciující kvetení (viz obr. 1) (Chiang *et al.*, 2009).



Obr. 1: Model propojení signalizačních drah pro kvetení a klíčení (upraveno podle Chiang, *et al.*, 2009). Vysoká míra exprese *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) během vývoje semene má za následek represi *APETALA 1* (*API*), což přímo či nepřímo ovlivní míru exprese *CYP707A2* a *GA20ox1* v klíčícím semeni prostřednictvím zatím neznámých signalizačních drah.

4.2 Světlo

Odpověď semene na světlo závisí na intenzitě světla, spektrálním složení a na fotoperiodě (Donohue *et al.*, 2007). Na základě studia huseníčku je obecně přijímáno, že světlo klíčení semen stimuluje (Finch-Savage *et al.*, 2006). Existují ale také rostliny, jejichž semena klíčí nezávisle na světle (Motsa *et al.* 2015; Chanyenga *et al.*, 2012) a rostliny, jejichž klíčení světlo inhibuje (Rasmussen, 1995). Např. u mnohých terestrických orchidejí je klíčovost ve tmě vyšší nebo semena některých orchidejí na světle neklíčí vůbec (Rasmussen, 1995).

Díky disturbanci půdy může být semeno vystaveno světlu, což se spolu s teplotou podílí na zrušení dormance (Finch-Savage *et al.*, 2007). Světlo totiž u huseníčku podporuje biosyntézu GA a zvyšuje citlivost k nim. Proto semena huseníčku ve tmě vyklíčí pouze při aplikaci exogenních GA (Derkx *et al.*, 1993).

Odpověď na světlo je zprostředkována fotoreceptory. Červené (650 nm) a *daleké* červené světlo (730 nm) je přijímáno dvěma izomery fytochromu, ale na podporu klíčení má vliv pouze aktivní forma fytochromu absorbující *daleké* červené světlo (Shinomura, 1997). Právě s touto formou fytochromu interaguje protein PIL5. Nadměrná exprese *PIL5* má za následek zhoršení potenciálu klíčení, a proto je *PIL5* klíčovým negativním regulátorem klíčení zprostředkovaného fytochromu (Oh *et al.*, 2004). Jelikož *PIL5* potlačuje expresi *GA3ox1* a *GA3ox2* a naopak aktivuje expresi *GA2ox*, exogenní aplikace GA může jeho negativní vliv na klíčení potlačit. Červené světlo spouští degradaci *PIL5*, čímž uvolní inhibici biosyntézy GA a podpoří klíčení (Oh *et al.*, 2006). Jak bylo napsáno výše, světlo podporuje biosyntézu GA a zvyšuje citlivost

k nim. PIL5 naopak potlačuje světlem podporovanou biosyntézu GA i zvýšenou citlivost k nim (Oh *et al.*, 2007).

Dále i exprese genů biosyntézy ABA: *ABA1*, *NCED6* a *NCED9*, která je potlačena světlem, a míra exprese *CYP707A2*, která je naopak zvýšená, je regulována přes PIL5 (Oh *et al.*, 2007). PIL5 spolu s SPT jsou jediní známí členové předpokládané regulační sítě spojující signály prostředí se signály endogenními (Penfield *et al.*, 2005).

Světlo může mít vliv nejen na zrušení, ale i na udržení dormance. Tak tomu je např. v případě modrého a zeleného světla u *Lolium rigidum* (Goggin *et al.*, 2008). Receptor zprostředkovávající odpověď semene na modré světlo ještě není s jistotou určen, ale s větší pravděpodobností se jedná o kryptochrom, nikoli o fototropin (Goggin *et al.*, 2008).

4.3 Dusičnany

Dusičnany jsou u většiny druhů rostlin hlavním zdrojem dusíku a zároveň fungují jako signalizační molekuly (Scheible *et al.*, 1997). Během after-ripeningu se semena stávají citlivější k vnějším signálům podporujícím klíčení a jako první reagují právě na dusičnany, poté na chlad a v poslední řadě na světlo (Finch-Savage *et al.*, 2007).

Studie s ekotypem *A. thaliana* Col-0 s nízkou dormancí zjišťovala vliv přísunu dusičnanů mateřské rostlině na dormanci semen (Alboresi *et al.*, 2005). Zvýšený přísun dusičnanů vedl k nižší úrovni dormance. Semena se sníženou aktivitou enzymu nitrátreduktáza redukcí dusičnanové ionty na dusitanové také vykazovala nižší dormanci v důsledku hromadění dusičnanů v rostlině (Alboresi *et al.*, 2005). V závislosti na tom také semena potřebovala méně GA ke klíčení. Tyto dva výsledky naznačují, že dusičnany jsou v regulaci dormance důležité spíše z hlediska signalizace, nikoliv výživy semene (Alboresi *et al.*, 2005).

V této signalizaci pravděpodobně hraje roli transportér dusičnanů NRT1.1. Je možné, že je zapojen do příjmu dusičnanů v imbibovaných semenech i v semenech vyvíjejících se na mateřských rostlinách a přispívá tak ke snížení dormance (Alboresi *et al.*, 2005). Další protein, který hraje úlohu v dusičnany indukovaném klíčení semen, je NIN-like protein 8 (NLP8). Semenům *nlp8* se ztrátou jeho funkce úplně chybí odezva na dusičnany (Yan *et al.*, 2016). Zatímco *nrt1.1* mutanti projevují při klíčení pouze sníženou citlivost k dusičnanům, která se navíc projevuje jen při jejich nízkých koncentracích (Alboresi *et al.*, 2005). NLP8 je tedy nezbytný pro stimulační účinek dusičnanů na klíčení semen (Yan *et al.*, 2016).

Výše popsané snížení dormance vlivem exogenních nebo endogenních dusičnanů se patrně promítá do snížení akumulace ABA prostřednictvím zvýšené míry exprese genu jejího katabolismu, *CYP707A2* (Matakiadis *et al.*, 2009). Exprese *CYP707A2* je v tomto případě aktivována NLP8 (Yan *et al.*, 2016).

Dusičnanové ionty ruší dormanci také u silně dormantního ekotypu *A. thaliana* Cvi, kde navíc bylo zjištěno, že přidání dusičnanu do média má za následek zvýšený oxidativní katabolismus ABA a zabrání její *de novo* syntéze (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Kromě dusičnanů má vliv na uvolnění dormance u huseníčku a dalších rostlin (např. ječmene nebo rýže) exogenní aplikace dusitanů, oxidu dusnatého nebo kyanidu (Bethke *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007a).

Ošetření semen inhibitorem oxidu dusnatého má za následek zvýšení dormance (Bethke *et al.*, 2005). Tento inhibitor má navíc i schopnost potlačit ztrátu dormance vyvolanou sloučeninami dusíku (tj. dusičnany, dusitany a kyanidem). To naznačuje, že právě oxid dusnatý je společnou složkou potřebnou k uvolnění dormance prostřednictvím těchto sloučenin dusíku (Bethke *et al.*, 2005).

4.4 Kouř

Kouř, který se uvolňuje z hořící vegetace, je stimulem pro zrušení dormance u semen rostlin z Austrálie, Severní Ameriky a jižní Afriky (Brown *et Staden*, 1997). Např. vystavení semen *Nicotiana attenuata*, druhu pocházejícího ze severoamerické pouště, který klíčí v období po požáru, kouři má za následek jejich zvýšenou citlivost ke GA (Schwachtje *et Baldwin*, 2004).

V kouři se vyskytují sloučeniny butenolidu, které se souhrnně nazývají karikiny (Dixon *et al.*, 2009). Hlavní sloučeninou izolovanou z kouře s pozitivním vlivem na zrušení dormance je butenolid 3-methyl-2Hfuro[2,3-c]pyran-2-one, který je označován jako karikinolid (KAR₁) (Flematti *et al.*, 2004; Dixon *et al.*, 2009).

Karikiny mohou zvýšit klíčení i u dormantních semen huseníčku, u kterého není známo, že by reagoval na kouř či oheň. Je tedy možné, že karikiny mají větší význam, než se původně předpokládalo (Nelson *et al.*, 2009). K tomu, aby mohly karikiny zvýšit klíčivost, potřebují GA. Toto tvrzení vychází z faktu, že u GA deficientních mutantů *gal-3* a dvojitých mutantů *ga3ox1 ga3ox2* není samo KAR₁ schopné obnovit klíčení (Nelson *et al.*, 2009).

Mutanti s necitlivostí ke karikinům, *karrikin insensitive 1 (kail-1)* a *kail-2*, mají zvýšenou dormanci, která nelze potlačit exogenní aplikací KAR₁. Fenotyp rostlin s jednou z těchto mutací je podobný fenotypu rostlin s mutací v *MORE AXILLARY GROWTH 2 (MAX2)*, které rovněž vykazují zvýšenou dormanci semen a necitlivost ke KAR₁, což vypovídá o nutnosti účasti MAX2 v odpovědi semene na karikiny (Nelson *et al.*, 2009).

Další sloučeninou izolovanou z kouře hořících rostlin je příbuzný butenolid 3,4,5-trimethylfuran-2(5H)-one, který redukuje efekt KAR₁ na zrušení dormance, pokud jsou aplikovány společně, a plně zabrání klíčení pokud je aplikován samostatně. Vzhledem k tomu, že mají podobnou strukturu, je možné, že butenolid 3,4,5-trimethylfuran-2(5H)-one určitým způsobem blokuje funkci KAR₁ nebo interaguje s jeho možným receptorem (Light *et al.*, 2010).

Závěr

Fyziologická dormance je stav, kdy by se mohlo zdát, že je semeno nečinné. I v tomto stavu ovšem neustále probíhá příjem signálů z okolí, jejich vyhodnocení a následně příslušná odezva na ně. Takovou odezvou je buď setrvání v dormantním stavu prostřednictvím další biosyntézy ABA, nebo uvolnění dormance následované klíčením, které je naopak podporováno *de novo* biosyntézou GA. Stejný signál působící na různá dormantní semena však nemusí vždy vést ke stejné odezvě, protože závisí také na hloubce dormance. Ta zpravidla odpovídá obsahu endogenní ABA v semeni a je určena předchozími podmínkami, kterým bylo semeno vystaveno. Hlavními zprostředkovateli dvou protichůdných procesů – dormance a klíčení – jsou tedy dva protichůdně působící fytohormony – ABA a GA. Faktorů, které dormanci ovlivňují, je ale velké množství. Některé další fytohormony, především etylen, BR a cytokininy, působí vůči ABA antagonisticky a podporují klíčení podobně jako GA.

Dormance je kromě fytohormonů regulována velkým množstvím faktorů, od podmínek prostředí, ve kterých se semeno nachází, až po změny na molekulární úrovni. Z podmínek prostředí mají na dormanci vliv především světlo, teplota, vlhkost a u některých rostlin také oheň či dusičnany v půdě. Podmínky prostředí způsobují ovlivnění exprese genů nejen pro syntézu a katabolismus ABA a GA, ale také různých TF či proteinových kináz modifikujících signalizaci ABA a citlivost k ní. Patrně však existují také dráhy regulující dormanci nezávisle na ABA, jak naznačuje např. studium genu *RDO5*, jehož produkt ovlivňuje proteiny APUM9 a APUM11, které pravděpodobně interagují s mRNA. V regulaci dormance se uplatňují také změny ve struktuře chromatinu znemožňující transkripci genů, jejichž produkty se podílejí na indukci dormance.

Přestože v posledních letech dochází v hojné míře k identifikaci nových faktorů regulujících dormanci, stále pravděpodobně neznáme všechny a u některých není znám přesný mechanismus účinku ani to, jak spolu vzájemně interagují. Také není známo, zda molekulární podstata dormance záleží na kombinaci mnoha rozdílných faktorů nebo zda existuje jeden ústřední činitel, který funguje v návaznosti na všechny ostatní faktory (Graeber *et al.*, 2012).

Seznam použitých zkratek

<i>aba</i>	ABA-deficientní mutant huseníčku a tabáku
ABA	kyselina abscisová
<i>abi</i>	<i>ABA-insensitive</i> ; ABA-insenzitivní mutant huseníčku
ACC	kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová
AMP1	ALTERED MERISTEM PROGRAM 1
AP1	APETALA 1
BR	brasinosteroidy
CBF	TF C-REPEAT BINDING FACTORS
Col-0	ekotyp huseníčku Columbia
Cvi	ekotyp huseníčku Cape Verde Islands
CYP707A	enzym katabolismu ABA, ABA 8'-hydroxyláza/cytochrom P450 707 A-typ
DOG1	DELAY OF GERMINATION
EIN	ETHYLENE INSENSITIVE
ETR	ETHYLENE RESISTANT, receptor etylénu
<i>flc</i>	<i>flacca</i> ; ABA-deficientní mutant rajčete
FLC	FLOWERING LOCUS C
FRI	FRIGIDA
FT	FLOWERING LOCUS T
FUS3	TF FUSCA 3
GA	gibereliny
<i>gal</i>	GA-deficientní mutant huseníčku
GA20ox	GA 20-oxidáza, enzym biosyntézy GA
GA2ox	GA 2 β -hydroxyláza, enzym katabolismu GA
GA3ox	GA 3 β -hydroxyláza, enzym biosyntézy GA
<i>gib-1</i>	GA-deficientní mutant rajčete
HUB1	HISTONE MONOUBIQUITINATION 1
JA	kyselina jasmonová
KAR1	karikinolid; butenolid 3-methyl-2Hfuro[2,3-c]pyran-2-one
LEC	TF LEAFY COTYLEDON
<i>Ler</i>	ekotyp huseníčku Landsberg <i>erecta</i>
MD	morfologická dormance
MFT	MOTHER OF FT AND TFL1
MPD	morfofyziologická dormance
NCED	9- <i>cis</i> epoxykarotenoid dioxygenáza, enzym biosyntézy ABA
NLP8	NIN (Nodule inception)-like protein 8

<i>not</i>	<i>notabilis</i> ; ABA-deficientní mutant rajčete
NRT1.1	Nitrate transporter 1.1, transportér dusičnanů
PD	fyziologická dormance
PIL5	PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3)-LIKE 5
PP2C	protein fosfatáza 2C
PY	fyzikální dormance
PYR/PYL/RCAR	receptory ABA
<i>rdo</i>	<i>reduced dormancy</i> ; ABA-deficientní mutant huseníčku
ROS	reaktivní formy kyslíku
<i>sit</i>	<i>sitiens</i> ; ABA-deficientní mutant rajčete
SnRK 2	proteinová kináza SNF1 (sucrose non-fermenting 1)-related protein kinase 2
SOC1	SUPPRESSOR OF CONSTANS OVEREXPRESSION 1
SPT	TF SPATULA
TF	transkripční faktor
<i>vp</i>	<i>viviparous</i> ; ABA-deficientní mutant kukuřice
WT	wild-type = původní "divoký" fenotyp

Seznam použité literatury

* sekundární citace jsou označeny hvězdičkou

- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M. T., Bedu, M., Meyer, C., & Truong, H. N.** (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 28(4), 500-512.
- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M. H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P., & Jullien, M.** (2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219(3), 479-488.
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., & Ecker, J. R.** (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, 284(5423), 2148-2152.
- Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C. J., Blankestijn-de Vries, H., & Koornneef, M.** (2003). Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 164(2), 711-729.
- Bahin, E., Bailly, C., Sotta, B., Kranner, I., Corbineau, F., & Leymarie, J.** (2011). Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant, Cell & Environment*, 34(6), 980-993.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M.** (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination*. Academic Press.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C.** (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed science research*, 14(1), 1-16.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Li, X.** (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15(2), 139-152.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., & Giraudat, J.** (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant Cell*, 12(7), 1103-1115.
- Bethke, P. C., Gubler, F., Jacobsen, J. V., & Jones, R. L.** (2004). Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta*, 219(5), 847-855.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G., & Jones, R. L.** (2005). Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 57(3), 517-526.
- Bleecker, A. B., Estelle, M. A., Somerville, C., & Kende, H.** (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 241(4869), 1086-1089.
- Brown, N. A. C., & Van Staden, J.** (1997). Smoke as a germination cue: a review. *Plant Growth Regulation*, 22(2), 115-124.

- Burbidge, A., Grieve, T. M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D. R., & Taylor, I. B. (1999).** Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *The Plant Journal*, 17(4), 427-431.
- Corbineau, F., Rudnicki, R. M., & Côme, D. (1988).** Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by high temperature. Possible involvement of ethylene biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 73(3), 368-373.
- Debeaujon, I., & Koornneef, M. (2000).** Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant physiology*, 122(2), 415-424.
- Derks, M. P. M., & Karssen, C. M. (1993).** Effects of light and temperature on seed dormancy and gibberellin-stimulated germination in *Arabidopsis thaliana*: studies with gibberellin-deficient and-insensitive mutants. *Physiologia Plantarum*, 89(2), 360-368.
- Donohue, K., Heschel, M. S., Chiang, G. C., Butler, C. M., & Barua, D. (2007).** Phytochrome mediates germination responses to multiple seasonal cues. *Plant, Cell & Environment*, 30(2), 202-212.
- * **Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006).** Seed dormancy and the control of germination. *New phytologist*, 171(3), 501-523.
- Finch-Savage, W. E., Cadman, C. S., Toorop, P. E., Lynn, J. R., & Hilhorst, H. W. (2007).** Seed dormancy release in *Arabidopsis* Cvi by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *The Plant Journal*, 51(1), 60-78.
- * **Finkelstein, R. R., Gampala, S. S., & Rock, C. D. (2002).** Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S15-S45.
- Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Trengove, R. D. (2004).** A compound from smoke that promotes seed germination. *Science*, 305(5686), 977-977.
- Footitt, S., Douterelo-Soler, I., Clay, H., & Finch-Savage, W. E. (2011).** Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20236-20241.
- Frey, A., Audran, C., Marin, E., Sotta, B., & Marion-Poll, A. (1999).** Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. *Plant molecular biology*, 39(6), 1267-1274.
- Gallardo, M., del Mar Delgado, M., Sanchez-Calle, I. M., & Matilla, A. J. (1991).** Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation in thermoinhibited *Cicer arietinum* L. seeds. *Plant Physiology*, 97(1), 122-127.

- Goggin, D. E., Steadman, K. J., & Powles, S. B.** (2008). Green and blue light photoreceptors are involved in maintenance of dormancy in imbibed annual ryegrass (*Lolium rigidum*) seeds. *New Phytologist*, 180(1), 81-89.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A. A., Vartanian, N., & Giraudat, J.** (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 11(10), 1897-1909.
- * **Graeber, K. A. I., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G. & Soppe, W. J.** (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, cell & environment*, 35(10), 1769-1786.
- Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E., & Jullien, M.** (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta*, 210(2), 279-285.
- Griffiths, J., Barrero, J. M., Taylor, J., Helliwell, C. A., & Gubler, F.** (2011). *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1* is involved in development of seed dormancy in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 6(5), e20408.
- Groot, S. P. C., & Karssen, C. M.** (1987). Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta*, 171(4), 525-531.
- Guan, L., & Scandalios, J. G.** (1995). Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), 5930-5934.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J. K., & Jacobsen, J. V.** (1995). Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *The Plant Cell*, 7(11), 1879-1891.
- Hu, Y., & Yu, D.** (2014). BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, tpc-114.
- Chanyenga, T. F., Geldenhuys, C. J., & Sileshi, G. W.** (2012). Germination response and viability of an endangered tropical conifer *Widdringtonia whytei* seeds to temperature and light. *South African journal of botany*, 81, 25-28.
- Chiang, G. C., Barua, D., Kramer, E. M., Amasino, R. M., & Donohue, K.** (2009). Major flowering time gene, *FLOWERING LOCUS C*, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11661-11666.
- Chiwocha, S. D., Cutler, A. J., Abrams, S. R., Ambrose, S. J., Yang, J., Ross, A. R., & Kermode, A. R.** (2005). The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *The Plant Journal*, 42(1), 35-48.

- Karssen, C. M.** (1995). Hormonal Regulation of Seed Development, Dormancy, and Germination Studied by Genetic Control. In Kigel, J., Galili, G., eds. *Seed development and germination* (pp. 333-351). Marcel Dekker.
- Karssen, C. M., & Lacka, E.** (1986). A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. In Bopp, M., ed. *Plant growth substances 1985* (pp. 315-323). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Karssen, C. M., Brinkhorst-Van der Swan, D. L. C., Breeklund, A. E., & Koornneef, M.** (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 157(2), 158-165.
- Kawakatsu, T., Taramino, G., Itoh, J. I., Allen, J., Sato, Y., Hong, S. K., Yule, R., Nagasawa, N., Kojima, M., Kusaba, M., Saka H., Nagato, Y., & Sakakibara, H.** (2009). *PLASTOCHRON3/GOLIATH* encodes a glutamate carboxypeptidase required for proper development in rice. *The Plant Journal*, 58(6), 1028-1040.
- KeÇpczyński, J., & KeÇpczyńska, E.** (1997). Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiologia Plantarum*, 101(4), 720-726.
- Kendall, S. L., Hellwege, A., Marriot, P., Whalley, C., Graham, I. A., & Penfield, S.** (2011). Induction of dormancy in *Arabidopsis* summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. *The Plant Cell*, tpc-111.
- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., & Ecker, J. R.** (1993). *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 72(3), 427-441.
- Kim, W., Lee, Y., Park, J., Lee, N., & Choi, G.** (2013). HONSU, a protein phosphatase 2C, regulates seed dormancy by inhibiting ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology*, 54(4), 555-572.
- Koornneef, M., Reuling, G., & Karssen, C. M.** (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 61(3), 377-383.
- * **Kucera, B., Cohn, M. A., & Leubner-Metzger, G.** (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15(4), 281-307.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y. & Nambara, E.** (2004). The *Arabidopsis* cytochrome P450 *CYP707A* encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO journal*, 23(7), 1647-1656.
- Le Page-Degivry, M. T., & Garello, G.** (1992). In situ abscisic acid synthesis: a requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant physiology*, 98(4), 1386-1390.

- Nelson, D. C., Riseborough, J. A., Flematti, G. R., Stevens, J., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Smith, S. M.** (2009). Karrikins discovered in smoke trigger *Arabidopsis* seed germination by a mechanism requiring gibberellic acid synthesis and light. *Plant physiology*, 149(2), 863-873.
- Lefebvre, V., North, H., Frey, A., Sotta, B., Seo, M., Okamoto, M., Nambara, E., & Marion-Poll, A.** (2006). Functional analysis of *Arabidopsis NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *The Plant Journal*, 45(3), 309-319.
- Léon-Kloosterziel, K. M., van de Bunt, G. A., Zeevaart, J. A., & Koornneef, M.** (1996). *Arabidopsis* mutants with a reduced seed dormancy. *Plant Physiology*, 110(1), 233-240.
- Leubner-Metzger, G., Fründt, C., & Meins, F.** (1996). Effects of gibberellins, darkness and osmotica on endosperm rupture and class I β -1, 3-glucanase induction in tobacco seed germination. *Planta*, 199(2), 282-288.
- Light, M. E., Burger, B. V., Staerk, D., Kohout, L., & Van Staden, J.** (2010). Butenolides from plant-derived smoke: natural plant-growth regulators with antagonistic actions on seed germination. *Journal of Natural Products*, 73(2), 267-269.
- Liu, H. Y., Yu, X., Cui, D. Y., Sun, M. H., Sun, W. N., Tang, Z. C., Kwak, S. S. & Su, W. A.** (2007a). The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. *Cell research*, 17(7), 638.
- Bewley, J. D.** (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7), 1055.
- Liu, Y., Geyer, R., Van Zanten, M., Carles, A., Li, Y., Hörold, A., Nocker, S., & Soppe, W. J.** (2011). Identification of the *Arabidopsis REDUCED DORMANCY 2* gene uncovers a role for the polymerase associated factor 1 complex in seed dormancy. *PLoS One*, 6(7), e22241.
- Liu, Y., Koornneef, M., & Soppe, W. J.** (2007b). The absence of histone H2B monoubiquitination in the *Arabidopsis hub1 (rdo4)* mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy. *The Plant Cell*, 19(2), 433-444.
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., & Zhang, J.** (2010). H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of experimental botany*, 61(11), 2979-2990.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930), 1064-1068.
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A., & Marion-Poll, A.** (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO journal*, 15(10), 2331-2342.

- Matakiadis, T., Alboresi, A., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J. P., Kamiya, Y., Nambara, E. & Truong, H. N.** (2009). The *Arabidopsis* abscisic acid catabolic gene *CYP707A2* plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiology*, 149(2), 949-960.
- *Matilla, A. J.** (2000). Ethylene in seed formation and germination. *Seed science research*, 10(2), 111-126.
- Motsa, M. M., Slabbert, M. M., Van Averbek, W., & Morey, L.** (2015). Effect of light and temperature on seed germination of selected African leafy vegetables. *South African Journal of Botany*, 99, 29-35.
- Nakabayashi, K., Bartsch, M., Ding, J., & Soppe, W. J.** (2015). Seed dormancy in *Arabidopsis* requires self-binding ability of DOG1 protein and the presence of multiple isoforms generated by alternative splicing. *PLoS Genetics*, 11(12), e1005737.
- Nakabayashi, K., Bartsch, M., Xiang, Y., Miatton, E., Pellengahr, S., Yano, R., Seo, M. & Soppe, W. J.** (2012). The time required for dormancy release in *Arabidopsis* is determined by DELAY OF GERMINATION1 protein levels in freshly harvested seeds. *The Plant Cell*, tpc-112.
- Nakamura, S., Abe, F., Kawahigashi, H., Nakazono, K., Tagiri, A., Matsumoto, T., ... & Mori, M.** (2011). A wheat homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 acts in the regulation of germination. *The Plant Cell*, tpc-111.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K.** (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2. 2, SRK2E/SnRK2. 6/OST1 and SRK2I/SnRK2. 3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1345-1363.
- Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K. & Hirayama, T.** (2005). Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44(6), 972-984.
- Oh, E., Kim, J., Park, E., Kim, J. I., Kang, C., & Choi, G.** (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 16(11), 3045-3058.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H. S., Sun, T., Kamiya, Y. & Choi, G.** (2007). PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, 19(4), 1192-1208.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W. I., & Choi, G.** (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 47(1), 124-139.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T. & Nambara, E.** (2006). *CYP707A1* and *CYP707A2*, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are

- indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(1), 97-107.
- Oracz, K., Bouteau, H. E. M., Farrant, J. M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau, F. & Bailly, C.** (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal*, 50(3), 452-465.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., ... & Alfred, S. E.** (2009). Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *science*, 324(5930), 1068-1071.
- Peeters, A. J., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C. J., Léon-Kloosterziel, K. M., Zeevaart, J. A., & Koornneef, M.** (2002). Characterization of mutants with reduced seed dormancy at two novel *rdo* loci and a further characterization of *rdo1* and *rdo2* in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 115(4), 604-612.
- Penfield, S., Josse, E. M., Kannangara, R., Gilday, A. D., Halliday, K. J., & Graham, I. A.** (2005). Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Current Biology*, 15(22), 1998-2006.
- Prusinski, J., & Khan, A. A.** (1990). Relationship of ethylene production to stress alleviation in seeds of lettuce cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(2), 294-298.
- Rasmussen, H. N.** (1995). *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.
- Raz, V., Bergervoet, J. H., & Koornneef, M.** (2001). Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*, 128(2), 243-252.
- Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S. J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S. G., Hedden, P. & Phillips, A. L.** (2008). The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle. *The Plant Journal*, 53(3), 488-504.
- Saini, H. S., Bassi, P. K., & Spencer, M. S.** (1985). Seed germination in *Chenopodium album* L: Relationships between nitrate and the effects of plant hormones. *Plant Physiology*, 77(4), 940-943.
- * **Shinomura, T.** (1997). Phytochrome regulation of seed germination. *Journal of Plant Research*, 110(1), 151-161.
- Shu, K., Liu, X. D., Xie, Q., & He, Z. H.** (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular plant*, 9(1), 34-45.
- Shu, K., Zhang, H., Wang, S., Chen, M., Wu, Y., Tang, S., Liu, C., Feng, Y., Cau, X. & Xie, Q.** (2013). ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 9(6), e1003577.

- Scheible, W. R., Gonzalez-Fontes, A., Lauerer, M., Muller-Rober, B., Caboche, M., & Stitt, M.** (1997). Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell*, 9(5), 783-798.
- Schuurink, R. C., Sedee, N. J., & Wang, M.** (1992). Dormancy of the barley grain is correlated with gibberellic acid responsiveness of the isolated aleurone layer. *Plant physiology*, 100(4), 1834-1839.
- Schwachtje, J., & Baldwin, I. T.** (2004). Smoke exposure alters endogenous gibberellin and abscisic acid pools and gibberellin sensitivity while eliciting germination in the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*. *Seed Science Research*, 14(1), 51-60.
- Schweighofer, A., Hirt, H., & Meskiene, I.** (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in plant science*, 9(5), 236-243.
- Steber, C. M., & McCourt, P.** (2001). A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 125(2), 763-769.
- Suzuki, M., Latshaw, S., Sato, Y., Settles, A. M., Koch, K. E., Hannah, L. C., Kojima, M., Sakakibara, H. & McCarty, D. R.** (2008). The maize *Viviparous8* locus, encoding a putative ALTERED MERISTEM PROGRAM1-like peptidase, regulates abscisic acid accumulation and coordinates embryo and endosperm development. *Plant Physiology*, 146(3), 1193-1206.
- Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L., Li, Q. B., Cline, K., & McCarty, D. R.** (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal*, 35(1), 44-56.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. & Shinozaki, K.** (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 106(41), 17588-17593.
- Vaistij, F. E., Gan, Y., Penfield, S., Gilday, A. D., Dave, A., He, Z., Josse, E. M., Choi, G., Halliday, K. J. & Graham, I. A.** (2013). Differential control of seed primary dormancy in *Arabidopsis* ecotypes by the transcription factor SPATULA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(26), 10866-10871.
- * Wang, K. L. C., Li, H., & Ecker, J. R.** (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The plant cell*, 14(suppl 1), S131-S151.
- Wang, L., Hua, D., He, J., Duan, Y., Chen, Z., Hong, X., & Gong, Z.** (2011). Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene *HB33* mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 7(7), e1002172.
- Wang, M., Heimovaara-Dijkstra, S., & Van Duijn, B.** (1995). Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta*, 195(4), 586-592.

- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Zhao, S., Liu, Z., Feng, Y. Q., & Wu, Y.** (2011). Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of *Arabidopsis* by downregulating *ABI5* expression. *The Plant Journal*, 68(2), 249-261.
- Xi, W., Liu, C., Hou, X., & Yu, H.** (2010). MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, tpc-109.
- Xiang, Y., Nakabayashi, K., Ding, J., He, F., Bentsink, L., & Soppe, W. J.** (2014). *Reduced Dormancy5* encodes a protein phosphatase 2C that is required for seed dormancy in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, tpc-114.
- Xie, Z., Zhang, Z. L., Hanzlik, S., Cook, E., & Shen, Q. J.** (2007). Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. *Plant molecular biology*, 64(3), 293-303.
- Yan, D., Easwaran, V., Chau, V., Okamoto, M., Ierullo, M., Kimura, M., Endo, A., Yano, R., Pasha, A., Gong, Y., Provart, N., Guttman, D., Krapp, A. Rothstein, S. J., Nambara, E. & Bi, Y. M.** (2016). NIN-like protein 8 is a master regulator of nitrate-promoted seed germination in *Arabidopsis*. *Nature communications*, 7, 13179.
- Zhou, S. F., Sun, L., Valdés, A. E., Engström, P., Song, Z. T., Lu, S. J., & Liu, J. X.** (2015). Membrane-associated transcription factor peptidase, site-2 protease, antagonizes ABA signaling in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 208(1), 188-197.